DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.20.005

论著

文章编号:1000-5404(2004)20-1806-03

31例中国汉族人外周血白细胞线粒体DNA高变Ⅰ区序列特殊变异分析

胡义德[1],贾立明[2],孙玉兰[3],孙恒文[1],刘丽红[1],叶明福[4],钱桂生[5],房殿春[6] (第三军医大学新桥医院:[1]肿瘤科,全军肿瘤诊治中心,[4]病理科,[5]全军呼吸内科研究所,全军呼吸病研究重点实验室,重庆 400037,[6]第三军医大学西南医院全军消化内科中心,重庆 400038;[2]解放军264医院内三科,太原 030001;[3]山东省泰安市中心医院肿瘤内科,泰安 271000)

提 要:目的 通过分析线粒体DNA序列,进一步了解中国汉族人线粒体基因多态性的特点。方法 一步法制备31个无亲缘关系的中国汉族个体的外周血白细胞线粒体DNA,PCR扩增包括非编码高变Ⅰ区在内的1 528 bp核酸片段,并直接测序,分析高变Ⅰ区序列变异情况。结果 高变Ⅰ区16 223和16 362核苷酸位点,分别出现高频率C→T变异(70.97%,22/31)及T→C变异(48.39%,15/31)。结论 线粒体DNA第16 223核苷酸位点T和第16 362核苷酸位点C很可能是中国汉族人特异性的单核苷酸多态性位点。

关键词:线粒体DNA;高变Ⅰ区;多态性
中图法分类号:Q523;R331.142;R394-33 文献标识码:A

Special mitochondrial DNA variation at the hypervariable region Ⅰ of peripheral white blood cells in 31 cases of Chinese Han population

HU Yi-de[1], JIA Li-ming[2], SUN Yu-lan[3], SUN Heng-wen[1], LIU Li-hong[1], YE Ming-fu[4], QIAN Gui-sheng[5], FANG Dian-chun[6]([1]PLA Cancer Center, [4]Department of Pathology, [5]Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, [6]Department of Gastrology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]Department 3, Internal Medicine, No. 264 Hospital of PLA, Taiyuan 030001, Shanxi Province; [3]Department of Oncology, Central Hospital of Tai'an City, Tai'an 271000, Shandong Province, China)

Abstract: Objective To know more polymorphic changes of mitochondrial DNA in Chinese Han population. Methods One-step method was used to acquire mtDNA samples from the peripheral white blood cells of 31 unrelated individuals of Han population in China. PCR analysis and direct sequencing were performed. The non-coding region HVR Ⅰ variations were also analyzed. Results High frequency nucleotide substitutions of C16223T (70.97%, 22/31) and T16362C (48.39%, 15/31) were demonstrated. Conclusion The results suggest that the position at the 16 223 and 16 362 nucleotides of mtDNA may be single nucleotide polymorphism (SNP) for Chinese Han population.

Key words: mitochondrial DNA; hypervariable region Ⅰ; polymorphism

人类线粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)位于细胞质的线粒体中,是细胞核外惟一存在的遗传物质,是由16 569个碱基对组成的双链环状分子,其非编码区在16 024-575核苷酸位点之间,大小为1 120 bp,含有三个高变区,即高变区(hypervariable region, HVR)Ⅰ、Ⅱ和Ⅲ。mtDNA具有高度的序列多态性,特别是在非编码区[1,2]。本研究通过对31例中国汉族人外周血白细胞mtDNA HVRⅠ区进行序列分析,探讨可能存在的单核苷酸多态性位点。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象 挑选31例无亲缘关系的中国汉族成人志愿者,其中男性28例,女性3例,年龄22~78岁,平均54.9岁。

1.1.2 主要试剂和引物 高保真PCR试剂盒及PCR产物纯化试剂盒购自Roche公司。自行设计扩增包括mtDNA部分编码区和全部非编码区在内的1 528 bp片段的引物,序列为:5′-ATTC-TAACCTGAATCGGAGG-3′和5′-GATGCTTGCATGTGTAATCT-3′,引物由中国科学院上海生物工程研究中心合成,PAGE纯化。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30080030);全军医学科学技术研究"十五"计划基金重点课题(01Z075)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30080030) and the Key Research Program of the "Tenth-five Year Plan" of PLA (01Z075)
作者简介:胡义德(1965-),男,重庆市潼南县人,博士,主任医师,教授,主要从事线粒体基因组相关疾病的基础与临床方面的研究。电话:(023)68774701
收稿日期:2004-02-13;修回日期:2004-07-05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.2　方法

1.2.1　外周血白细胞 mtDNA 的提取　　各抽取肝素抗凝静脉血 2~3 ml, mtDNA 的提取、纯化和鉴定参见文献[2, 3]。

1.2.2　PCR 扩增及产物纯化、鉴定　　用高保真 PCR 试剂盒扩增目的片段: 10× PCR 反应缓冲液 5 μl, 20 μmol/L 的 dNTP4 μl, 0.5 μmol/L 引物各 1.5 μl, 高保真 DNA 多聚酶 2.5 U, mtDNA 模板 50 ng, 加双蒸水到反应体系为 50 μl。

反应条件为: 94 ℃ 5 min 预变性, 94 ℃ 1 min, 55 ℃ 1 min, 72 ℃ 2 min, 共 35 个循环, 最后延伸温度为 72 ℃ 7 min。PCR 产物纯化采用 Roche 纯化试剂盒, 鉴定采用含溴化乙锭(EB)的 0.8% 琼脂糖凝胶电泳。

1.2.3　PCR 产物测序　　以 1 528 bp PCR 产物核酸片段为测序模板, 测序用 1 528 bp 片段的上游引物, 在 ABIprism3700 型测序仪上, 采用双脱氧四色荧光染料标记法自动测读序列。

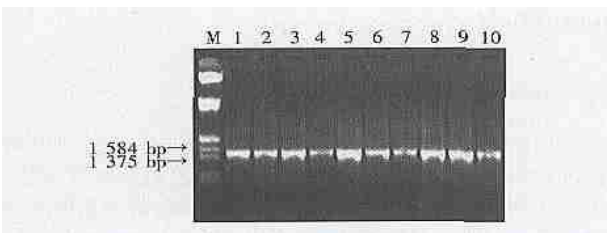
1.3　测序数据分析

采用 DNAStar 软件分析测序数据, 校对序列采用基因库 H. sapiens mitochondrial genome[V00662.1 GI: 13003] 版本, 碱基变异率= 变异碱基总数/所测碱基总数× 100%。

2　结果

2.1　目的核酸片段 PCR 扩增分析

31 例中国汉族成人志愿者白细胞 mtDNA PCR 扩增产物均呈 1 528 bp 大小的清晰目的片段条带, 由含 EB 的 0.8% 琼脂糖电泳验证, 图 1 所示。



M: Marker; 1— 10: PCR products of 10 healthy controls

图 1　外周血 mtDNA PCR 电泳结果图

Fig 1　Electrophoretic result of mtDNA by PCR

2.2　mtDNA 非编码 HVRⅠ区序列变异情况

所测 1 528 bp 核酸片段中, 非编码 HVRⅠ区(核苷酸位点 16 024-16 365 之间)有 136 个变异发生, 碱基平均变异率为 1.282 8%, 主要碱基变异为 C→T 和 T→C, 占全部变异的 81.62%(111/136), 其中 C→T 变异率为 46.32%(63/136), T→C 变异率为 35.29%(48/136), 少见碱基变异为 G-A、A-G、A-C、C-A、C-G 替换和 A 缺失。

2.3　HVRⅠ区特殊变异位点分析

在第 16 223 核苷酸位点, 共出现了 22 个 C→T 变异, 发生率为 70.97%(22/31), 在第 16 362 核苷酸位点, 共出现了 15 个 T→C 变异, 发生率为 48.39%(15/31), 核甘酸位点 16 164-16 233 之间碱基变异序列如下。

序列	AAACCCA	ATCCACATCA	AAAGCCCCTC	CCCATGCTTA	CAAGCAAGTA	CAGCAATCAA	CCCTCAACTA	TCA
1	AAACCCA	ATCCACATCA	AAAGCCCCTC	CCCATGCTTA	CAAGCAAGTA	CAGCAATCAA	CCTTCAACTA	TCA
2	AAACCCA	ACCCACATCA	AAAGCCCCTC	CCCATGCTTA	CAAGCAAGTA	CAGCAATCAA	CCCTCAACTA	TCA
3	AAACCCA	ATCCACATCA	AAATCCCCCC	CCCATGCTTA	CAAGCAAGTA	CAGCAATCAA	CCTTCAACTA	TCA
4	AAACCCA	ATCCACATCA	AAAGCCCCTC	CCCATGCTTA	CAAGCAAGTA	CAGCAATCAA	CCTTCAACTA	TCA
5	AAACTCA	ACCCACATCA	AAAGCCCCTC	CCCATGCTTA	CAAGCAAGCA	CAGCAATCAA	CCCTCAACTA	TCA
6	AAACCCA	ATCCACATCA	AAAGCCCCTC	CCCATGCTTA	CAAGCAAGTA	CAGCAATCAA	CCTTCAACTA	TCA
7	AAACCCA	ATCCACATCA	AAACTCCCTC	CCCATGCTTA	CAAGCAAGTA	CAGCAATCAA	CCTTCAACTA	TCA
8	AAACCCA	ACCCACATCA	AAAGCCCCTC	CCCATGCTTA	CAAGCAAGTA	CAGCAATCAA	CCCTCAACTA	TCA
9	AAACCCA	ATCCACATCA	AAAGCCCCTC	CCCATGCTTA	CAAGCAAGTA	CAGCAATCAA	CCTTCAACTA	TCA
10	AAACCCA	ATCCACATCA	AAAGCCCCTC	CTCATGCTTA	CAAGCAAGTA	CAGCAATCAA	CCCTCAACTA	TCA
11	AAACCCA	ATCCACATTA	AAAGCCCCTC	CCCATGCTTA	CAAGCAAGTA	CAGCAATCAA	CCTTCAACTA	TCA
12	AAACCCA	ATCCACATCA	AAAGCCCCTC	CCCATGCTTA	CAAGCAAGTA	CAGCAATCAA	CCTTCAACTA	TCA
13	AAACCCA	ACCCACATCA	AAAGCCCCTC	CCCATGCTTA	CAAGCAAGTA	CAGCAATCAA	CCCTCAACTA	TCA
14	AAACCCA	ACCCACATCA	AAAGCCCCTC	CCCATGCTTA	CAAGCAAGTA	CAGCAATCAA	CCTTCAACTA	TCA
15	AAACCCA	ATCCACATCA	AAAGCCCCTC	CCCATGCTTA	CAAGCAAGTA	CAGCAATCAA	CCTTCAACTA	TCA

3　讨论

mtDNA 位于线粒体内, 环境特殊, 处在活性氧和其他自由基包围之中, 更由于缺乏组蛋白保护, mtDNA 很容易发生突变。迄今在总长仅 16 569 bp 的线粒体基因组上累积的多态性位点接近 1 000 个, 平均十几个碱基就有一个多态性。特别是非编码的 D-环(D-Loop)区, 多态性位点多达 400 余个[4~7]。这些发现不仅加深了我们对 mtDNA 特殊的复制方式(不对称复制)及缺乏有效的自我修复系统的认识, 也使 mtDNA 在疾病发生、生物进化、种族迁移的研究, 异种之间、同种之间亲缘关系的鉴定方面具备了相当大的研究和应用价值, mtDNA 作为一种分子标记, 多年来对其多态性的研究一直持续不断。

文献[8, 9]报道, 在健康德国人中, HVR Ⅰ平均变异率为 0.13%、HVR Ⅱ为 0.12%、HVR Ⅲ为 0.10%。国内顾明波等[10]在进行 mtDNA 碱基变异研究中发现, 绝大多数中国人在 5 个位点与 Anderson 序列有明显的差异, 其中包括 16 223(核酸替代由 C→T 占 74.77%)、16 362(T→C 占 53.15%)位点。本研究的中国汉族成人中, HVR Ⅰ平均变异率高达 1.282 8%, 约为德国人的 10 倍, 深入分析其 HVR Ⅰ平均变异率显著升高的主要原因, 是在第 16 223 核苷酸位点出现了高频率的 C→T 变异(70.97%, 22/31), 16 362 位点出现了高频率的 T→C 变异(48.39%, 15/31), 同顾明波等[10]的报道基本相符。尽管这些变化在其它的群体中也同样存在, 但在每个群体中的比率是不同的。韩国人群 16 223 位点 C→T 占 80%, 16 362 位点 T→G 占 39.9%; 日本人群的 16 223 位点 C→T 占 75.7%, 16 362 位点 T→C 占 50%; 均与中国汉族人群资料十分相似。而高加索人 16 223 位点 T 碱基占 44.2%, 16 362 位点 C 碱基占 15.3%; NuuNulths 人 16 223 位点 T 碱基占 64.2%, 16 362 位点 C 碱基占 15.3%; 均与中国、日本、韩国人群的统计资料有所不同, 具有明显的人种差

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

异[11]。这些差异被普遍认为是由于 mtDNA 的高进化率所引起的[12]。因此，mtDNA 第 16 223 核苷酸位点 C→T 替换和第 16 362 核苷酸位点 T→C 替换，很可能是中国汉族人的特异性单核苷酸多态性位点，进一步研究鉴定其性质具有特别重要的意义。

参考文献：

[1] Bogenhagen D, Clayton D A. The number of mitochondrial deoxyribonucleic acid genomes in mouse L and human Hela cells[J]. J Biol Chem, 1974, 249(24): 7991－7995.
[2] 胡义德，钱桂生，陈维中，等. 一步法快速制备培养细胞线粒体 DNA[J]. 中华医学遗传学杂志，1997，14(4)：250－251.
[3] 贾立明，叶明福，刘丽红，等. 改良一步法制备人外周血白细胞线粒体 DNA[J]. 第三军医大学学报，2004，26(15)：1407－1409.
[4] 陈 伟，李 钰，陈 宇，等. 中国北方汉族人 mtDNA D 环多态性研究[J]. 中华医学遗传学杂志，1999，16(4)：246－248.
[5] 汪宪平，林标杨. 20 例藏族人 mtDNA 多态性研究[J]. 遗传，1992，14(2)：24－26.
[6] Kogelnik A M, Lott M T, Brown M D, *et al*. MITOMAP: a human mitochondrial genome database—— 1998 update[J]. Nucleic Acids Res, 1998, 26(1): 112－115.
[7] Attimonelli M, Cooper J M, D' Elia D, *et al*. Update of the human MitBASE database[J]. Nucleic Acids Res, 1999, 27(1): 143－146.
[8] Lutz S, Wittig H, Weisser H J, *et al*. Is it possible to differentiate mtDNA by means of HVIII in samples that cannot be distinguished by sequencing the HVI and HVII regions[J]? Forensic Sci Int, 2000, 113(1－3): 97－101.
[9] Lutz S, Weisser H J, Heizmann J, *et al*. Location and frequency of polymorphic positions in the mtDNA control region of individuals from Germany[J]. Int J Legal Med, 1998, 111(2): 67－77.
[10] 顾明波，柳 杰，杜庆新，等. 中国汉族人群的线粒体 DNA 控制区多态性研究[J]. 中国法医学杂志，2001，16(1)：6－9.
[11] Lee S D, Shin C H, Kim K B. Sequence variation of mitochondrial DNA-control region in Koreans[J]. Forensic Science Int, 1997, 87(2): 99－116.
[12] Thomas W K, Beckenbach A T. Variation on salmonid mitochondrial DNA: evolutionary constraints and mechanisms of substitution[J]. J Mol Evol, 1989, 29(3): 233－245.

（编辑 刘洪娥）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2004)20-1808-01

经皮激光椎间盘减压术及其护理配合

Nursing of patients undergoing percutaneous laser disk decompression

陈 洁，游 箭，牟 玮，张永克 （第三军医大学西南医院放射科，重庆 400038）

自 Choy 和 Ascher 等于 1986 年首先在临床上应用经皮激光椎间盘气化减压术（percutaneous laser disk decompression, PLDD）治疗腰椎间盘突出症并获得成功以来，因 PLDD 损伤小、操作方便、术后恢复快等特点，使该法得到了迅速的发展[1～3]，为顺利的完成该手术，手术前后的护理准备和术中配合是十分重要的，现将我科 82 例 PLDD 护理配合的初步体会介绍如下。

1 临床资料

1.1 一般资料

本组共 82 例经 CT、MRI 检查，证实有椎间盘突出患者；男 61 例，女 21 例；年龄 23～74（45.2±11.7）岁；病程 6 个月至 13 年，本次发病或加重至手术的时间为 5 d 至 2 个月，平均 19.5 d。均有频繁发作的腰腿痛、下肢麻木、跛行或一侧肢体感觉异常、活动受限等表现，直腿抬高试验均呈阳性；本组病例全部经保守治疗两个月以上而疗效不佳者。

1.2 术前准备

首先向病人及家属说明本手术创伤小、恢复快、安全性高的特点以消除病人的思想顾虑，争取病人配合。术前 1 d 给患者清洗背部，检查血常规、出凝血时间、血小板及肝肾功能，做普鲁卡因和青霉素过敏试验。检查机器设备，特别是激光器的性能情况。术前进行空气消毒。备好术中用品，如 18 G 穿刺针，光纤，三通管等。

1.3 手术方法

患者取患侧卧位或俯卧位，消毒铺单，局麻，注意不能将神经根麻醉。一般于 L3～S1 节段选择受累平面中线旁开 8～14 cm 处，与腰背矢状平面呈 35°～45°角度进针，在 X 线下将穿刺针刺入病变椎间盘中；L5～S1 节段则于髂嵴上缘中线旁开 6～8 cm 处为进针点，与冠状面呈 45°～60°角，与腰背面呈 35°～45°角斜向骶尾侧穿刺。透视下针尖位置在椎间盘中央，前后位显示针尖位于中央偏患侧，侧位显示针尖位于椎间盘中后 1/3 处。插入光纤释放激光，释能条件为 15 W×1 s×0.5 s（功率×持续时间×间隔时间），总能量因人而异，一般一个椎间隙约释能1 500～2 000 J。

2 护理配合

2.1 术中配合

术中除连接好各种线路、管道，核查好激光功率外，应配合

（下转 1811 页）

作者简介：陈 洁（1960－），女，江苏省南京市人，主管技师，发表论文 15 篇。
电话：（023）68754474

收稿日期：2004-03-02；修回日期：2004-06-28

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net